

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Miroslav Bašta

Bezmembránové buněčné organely – funkce a metody studia
Membraneless organelles – physiological functions and experimental techniques of their study

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Cyril Bařinka, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Rád bych poděkoval RNDr. Cyrilu Bařinkovi, PhD. a Mgr. Janě Nedvědové za jejich ochotu, trpělivost a cenné rady.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Práce ani žádná z jejích částí nebyla využita k získání jiného nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace.

V Praze dne

.....

Abstrakt

Bezmembránové organely, také nazývané jako biomolekulární kondenzáty nebo proteinové kapénky, jsou kapalné, sférické útvary tvořící se ve všech buněčných kompartmentech se složením jen o málo odlišným od svého okolí. Obsahují zpravidla stovky různých typů proteinů a nukleových kyselin a plní v buňce mnoho významných funkcí. Vznikají procesem zvaným fázová separace dvou kapalin, kdy se v roztoku vytvoří fázové rozhraní za účelem snížení celkové volné energie systému. Takový proces může být iniciován vnějším stresem, vnitřními procesy buňky nebo mutacemi v DNA. Existuje mnoho známých typů bezmembránových organel a každým rokem přibývají další. Jejich funkce zahrnují především lokalizaci jednotlivých makromolekul a biochemických reakcí s nimi spojených, regulaci biochemických reakcí a transport makromolekul v buňce. Tato práce představuje stručné shrnutí tématiky bezmembránových organel s několika konkrétními příklady a velmi stručně popisuje několik vybraných metod jejich studia.

Klíčová slova: bezmembránové organely, biomolekulární kondenzáty, proteinové kapénky, fázová separace, kapalná fáze

Abstract

Membraneless organelles, also called biomolecular condensates or protein droplets, are liquid spheric bodies present in an every cell compartment. Their composition and density is only slightly different from their surroundings. They consist of hundreds of types of proteins and nucleic acids and they are responsible for various biological functions. They are formed via liquid-liquid phase separation that creates a phase boundary in a solution of macromolecules in order to decrease the low free energy of the system. This process is initiated by external stress, internal cell processes or mutations in DNA. There are many identified types of membraneless organelles and each year there are more added on the list. Their functions include localization of macromolecules and related biochemical reactions, tuning of biochemical reactions and transport of macromolecules throughout the cell. This thesis presents a brief summary of the topic of membraneless organelles with several specific examples and very briefly describes several selected methods of their study.

Key words: membraneless organelles, biomolecular condensates, protein droplets, phase separation, liquid phase

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Pohled na bezmembránové organely v průběhu času.....	2
3. Proces vzniku a základní charakteristiky bezmembránových organel.....	3
4. Příklady bezmembránových organel.....	5
4.1 Jadérko (Nucleolus).....	6
4.2 Cajalova tělíska (coiled bodies).....	7
4.3 Speckles (Interchromatin Granule Clusters):.....	8
4.4 Paraspeckles.....	9
4.5 Stresová granula.....	10
5. Neurodegenerativní choroby a virové infekce ve vztahu k bezmembránovým organelám.....	12
6. Metody výzkumu bezmembránových organel.....	13
6.1 Mikroskopie.....	13
6.2 Metody používané <i>in vitro</i>	15
6.3 Počítačové modely.....	18
7. Závěr.....	19
Zdroje.....	20

Zkratky

ALS – Amyotrofická laterální skleróza

RNA – ribonukleová kyselina

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

LLPS – fázová separace dvou kapalin (liquid-liquid phase separation)

IDR - vnitřně neuspořádaný region (intrinsically disordered region)

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

snRNP - malý jaderný ribonukleoprotein

lncRNA – dlouhá nekódující ribonukleová kyselina

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

1. Úvod

Buňka je v biologii definovaná jako základní stavební a funkční jednotka živých organismů.

Eukaryotická buňka sama má mnoho částí a funkčních celků - organel, některé oddělené membránami a některé spíše ve formě shluků proteinů a nukleových kyselin. Cílem této práce je představit právě takové shluky vzniklé fázovou separací a metody jejich studia.

Za definovaných podmínek, například za určité teploty, pH, koncentrace solí a koncentrace určitých makromolekul se může mechanismem fázové separace v buňce zformovat proteinová kapénka (protein droplet). Ta může obsahovat až o dva řády vyšší koncentraci komponent než okolní prostředí (dispergovaná fáze), od které je oddělená fázovým rozhraním. Dispergovanou fází v tomto případě může být například cytozol nebo nukleoplazma.

Proteinová kapénka, nebo také bezmembránová organela je tedy shlukem vzájemně provázaných molekul proteinů a nukleových kyselin vznikající v buňce jako odpověď na určitý vnější signál nebo existující v průběhu celého buněčného cyklu. Existuje mnoho typů těchto organel plnících v buňce nejrůznější funkce. Příkladem mohou být stresová granula sloužící jako dočasná skladiště netranslatované mediátorové ribonukleové kyseliny nebo jadérko se svou nezaměnitelnou rolí v biosyntéze ribozomů.

Fyzikálním mechanismem vzniku bezmembránových organel je prostorová separace dvou kapalných fází na základě tendence systému zaujmout stav s minimální volnou energií. Ten je dosažen zvýšením celkové entropie a snížením celkové entalpie v důsledku vytvoření fázového rozhraní. Podmínkou pro koexistenci dvou separovaných fází je stejný chemický potenciál a stejná hodnota volné energie pro obě tyto fáze, které se liší v koncentraci obsažených makromolekul.

Důležitými vlastnostmi těchto kapének jsou termodynamická reverzibilita a dynamicky se měnící struktura. Bezmembránové organely vzniklé fázovou separací bývají zpravidla kapalné, ale bylo popsáno, že díky určitým patologickým dějům se mohou stát základem pro tvorbu pevných proteinových plaků jako je tomu například u Alzheimerovy choroby nebo amyotrofické laterální sklerózy.

2. Pohled na bezmembránové organely v průběhu času

První popsané vědecké pozorování fázové separace u polymerů organických sloučenin se objevuje na sklonku třicátých let dvacátého století, kdy je Bronstedem (1938¹ a 1939²) popsána jako otékání (swelling) závislé na složení směsi, teplotě a koncentraci jednotlivých komponent. Krátce poté se objevují teorie popisující tento fenomén^{3,4,5} a rozšiřující naše porozumění i na heterogenní polymery⁶. Postupně dochází k jejich vývoji až po v současnosti přijímané pojetí od Escobedy a DePabla⁷.

První pozorovanou organelou, kterou dnes řadíme k fázově separovaným, bylo jadérko popsané nezávisle R. Wagnerem už v roce 1835⁸ nebo G. Valentinem 1836⁹ spíše jako anatomická zajímavost v jádře buňky, než jako funkční celek. Zájem o něj byl v průběhu devatenáctého století a na počátku století dvacátého malý snad jen s výjimkou Montgomeryho monografie¹⁰ z roku 1898. V roce 1903 a 1910 byly v jádře R. Cajalem popsány Cajalova tělíska¹¹ a speckles¹².

Zlom ve vnímání kapének přinesly až články od E. Heitze (1931)¹³ a B. McClintock (1934)¹⁴ identifikující organizátor jadérka (nucleolus organiser region, v článku jako nucleolar-organizing body) jako součást chromosomu a poprvé tak vytvořili souvislost mezi bezmembránovou organelou (jadérkem) jako anatomickou strukturou a procesem, jakým by mohlo vznikat. Dalším významným krokem k porozumění funkce jadérka bylo objevení souvislosti mezi jeho přítomností v buňce a syntézou ribozomální RNA (1964)¹⁵. V 60. letech se také objevily první EM snímky organel a bylo zjištěno, že jadérko buňky modelového organismu *Xenopus laevis* obsahuje geny pro 40S rRNA¹⁶. Na přelomu tisíciletí se začínají objevovat studie popisující transport a lokalizaci jednotlivých molekul v buňce a jednotlivým organelám se dostává mnohem více pozornosti z hlediska jejich molekulárního složení a funkce, příkladem může být znovu jadérko^{17,18,19} nebo Cajalova tělíska^{20,21}. Zhruba ve stejné době se také objevují první studie popisující rychlou difuzi jednotlivých molekul do nitra organel a zpět do okolní plasmy^{22,23} a postupně se začíná formovat představa bezmembránových organel jako biomolekulárního kondenzátu.

Zajímavostí může být, že už v průběhu 70. let minulého století se objevují spojitosti mezi fázovou separací a různými onemocněními. Příkladem může být článek T. Tanaky²⁴ kde se autor zabývá procesem vzniku katarakty u čoček mladých myší.

V posledních 20 letech se projevuje stále vzrůstající zájem o tematiku bezmembránových organel, nejen o obecné principy jejich vzniku a funkce, ale také o jednotlivé organely, jejich komponenty a jejich roli ve fyziologii buňky.

3. Proces vzniku a základní charakteristiky bezmembránových organel

Bezmembránové organely, označované také jako bezmembránové kompartmenty, biomolekulární kondenzáty nebo proteinové kapénky, jsou kapalné útvary sférického tvaru oddělené od okolního roztoku fázovým rozhraním¹. Vznikají fázovou separací dvou kapalin (liquid-liquid phase separation, LLPS). Součástí větších biomolekulárních kondenzátů může být v určitých případech další fázové rozhraní, vytvářející v organelu jakýsi sférický subkompartment mající odlišné složení a funkci²². Organely jsou charakteristické relativně rychlou výměnou molekul se svým okolím a při setkání s další kapénkou stejného typu mají tendenci splývat²⁵.

Kapénky mohou přecházet z tekutého do gelového stavu²⁶ a některé z nich takový stav dokonce preferují²⁷. Gelové agregáty nejsou schopné splývání, ale stále si zachovávají sférický tvar a jsou rozpustné, připomínají shluky deformovaných sfér, které se na sebe mohou lepit. Další agregovanou formou biomolekulárních kondenzátů jsou fibrily, které ztrácí sférický tvar a jsou nerozpustné. Kapénky tvořené strukturovanými proteiny mohou krystalizovat.

Fázové rozhraní se v kapalině objevuje v případě, kdy se její molekuly mohou uspořádat do dvou různých stavů (fází), které se liší koncentrací svých komponent, za podmínky, že obě uspořádání existují ve stavu se stejnou, nízkou, volnou energií a mají stejný chemický potenciál. Kapénková fáze vykazuje zpravidla vyšší koncentraci některé z jejích komponent oproti svému okolí a snížení volné energie je zde dosaženo energeticky výhodnějším uspořádáním makromolekul a jejich interakcemi. Důsledkem je snížení entalpie v kapénkové fázi. Naopak pro dispergovanou (dispersed) fázi je typická nižší koncentrací dané složky a tedy zvýšená entropie.

Biomolekulární kondenzáty vznikají pouze ve vhodném rozmezí teplot, pH, koncentrací solí a za přítomnosti relevantních makromolekul. Pokud dojde ke změně některého z těchto parametrů přes svrchní či spodní kritickou mez, organela se rozpustí. Pokud se ale parametry navrátí do svých původních hodnot, organela se znovu zformuje a je tedy termodynamicky reverzibilní (Obrázek 1).

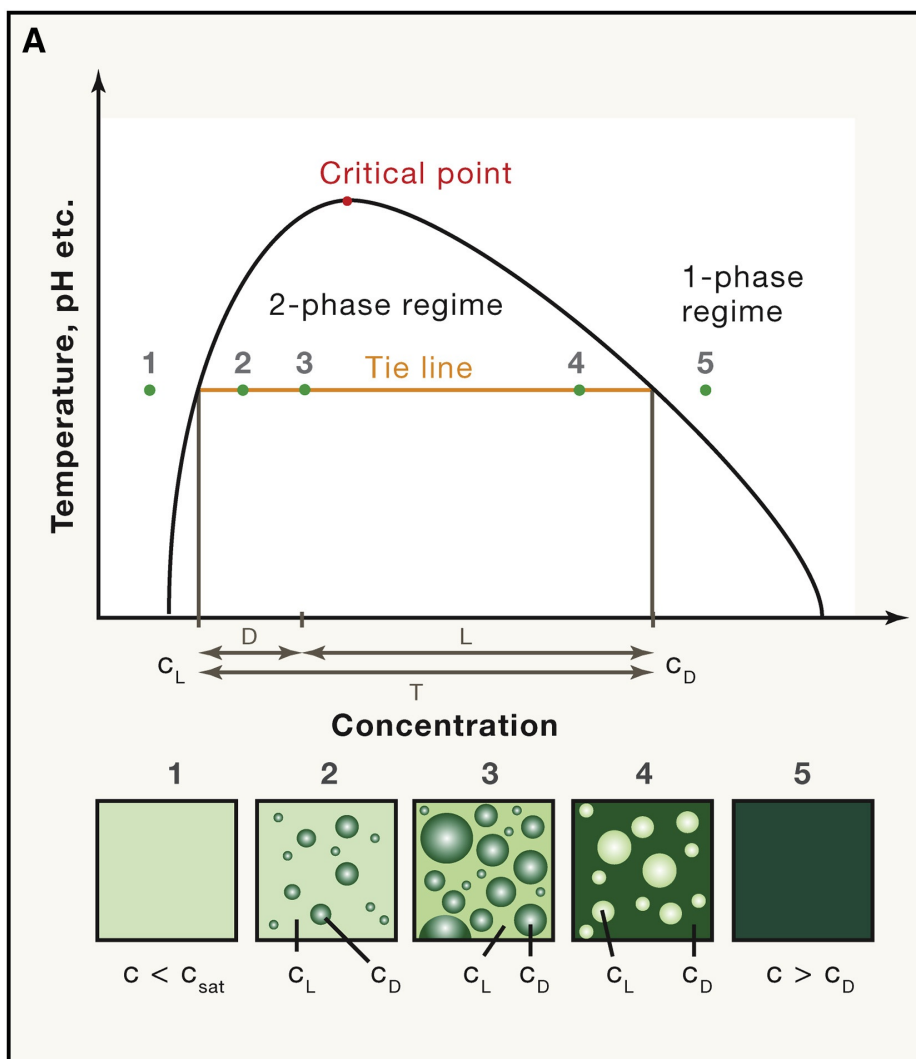
Kapénku je možné si představit jako shluk vzájemně interagujících proteinů a nukleových kyselin vytvářející jakési lešení s pravidelnější strukturou u středu organely a nestrukturované na jejím okraji, kterým se prodírá množství dalších makromolekul, které se místy reverzibilně váží^{28,29}. Pro vytvoření takové struktury je důležitá multivalence proteinů dosahovaná větším počtem strukturovaných domén³⁰ nebo přítomností vnitřně neuspořádaných oblastí (intrinsically disordered region, IDR) schopných interakce s různými vazebnými partnery.

Vnitřně neuspořádané oblasti se vyznačují schopností zaujímat více různých konformací a interagovat tak množstvím vzájemně nepodobných molekul. Pokud protein obsahuje více vnitřně neuspořádaných oblastí, má možnost tvořit více heterotypických (s jinými molekulami) i homotypických (sám se sebou) kontaktů a dát tím vznik trojrozměrné síti, která pak slouží jako výše zmíněné lešení. Různé typy IDR odpovídají na různé stimuly a určují některé vlastnosti vzniklé kapénky jako například koncentraci jejích komponent anebo její viskoelasticitu³¹. IDR se mohou lišit například svou délkou, počtem

hydrofobních reziduí, jejich typem, počtem aminokyselin oddělující taková rezidua a stejně tak i počtem, typem a vzdáleností reziduí nabitých.

Posttranslační modifikace a mutace DNA ovlivňují strukturu separujících se proteinů a tak i proces, jakým dochází k jejich fázové separaci (přehledně shrnuto v Hofweber a Dormann 2019³²).

Na vznik bezmembránových organel má v některých případech velký vliv přítomnost a koncentrace ribonukleových kyselin. Přidáním malého množství RNA k proteinům schopným vazby RNA lze docílit snížení kritické koncentrace pro LLPS., Naopak vysoké koncentrace přidané RNA mohou vést k rozpuštění organely³³.



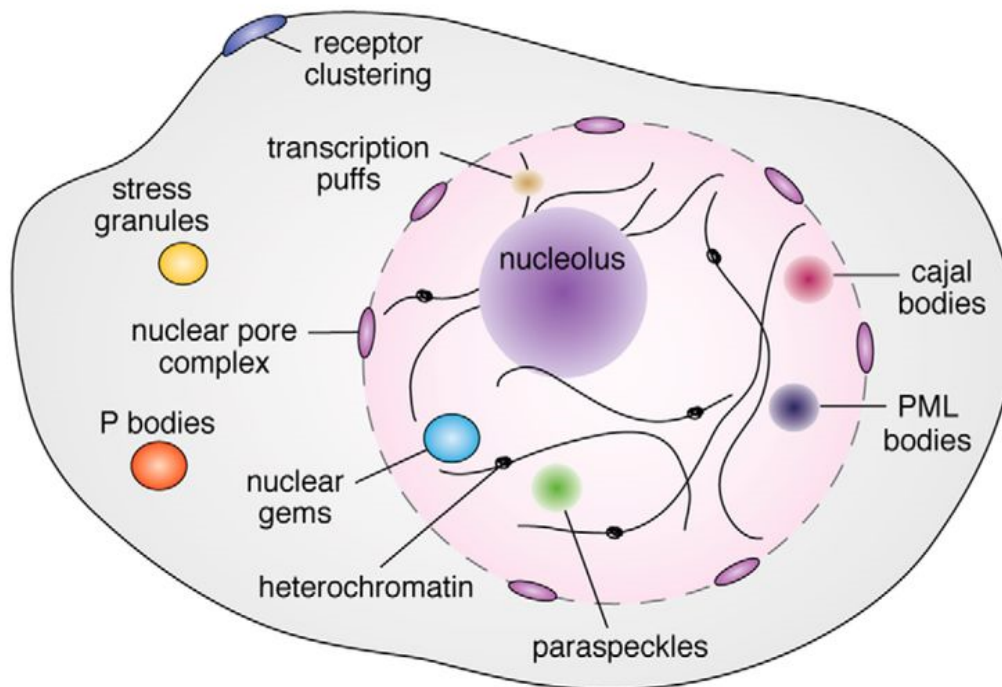
Obrázek 1: Schéma fázového diagramu: Křivka koexistence dvou kapalných fází (černá) znázorňuje kritické hodnoty parametrů, za kterých dochází k vytvoření kapének a odděluje tak od sebe situaci, kdy se kapénky tvoří („2-phase regime“) a situaci, kdy je roztok homogenní („1-phase regime“). K fázové separaci nedochází, pokud hodnoty parametrů překročí kritický bod (critical point).

Pod grafem je znázorněno pět různých situací, které mohou nastat při konstantní teplotě, pH, atp. (tie line) za měnění se celkové koncentrace proteinu v roztoku. C = koncentrace proteinu, C_{sat} = kritická koncentrace, C_L = koncentrace proteinu v dispergované fázi, C_D = koncentrace proteinu v kapénkové fázi; převzato z Alberti 2018³⁴, upraveno

4. Příklady bezmembránových organel

Z důvodu zatím nepřesné definice pojmu bezmembránových organel můžeme do jejich výčtu řadit mnoho nepříliš si podobných shluků molekul od vzájemně provázaných enzymatických kaskád přes různé druhy ribonukleoproteinových částic až po obecně uznávané příklady jako Cajalova tělíska nebo široké spektrum stresových granul. V této práci je proto uvedeno jen pět organel, kterým se věnuji blíže a souhrnná tabulka na konci kapitoly, kde přidávám ještě několik dalších příkladů.

Za zmínku také stojí několik biomolekulárních kondenzátů, které vznikají fázovou separací, ale které nemůžeme označit za bezmembránové organely. Jsou to lipidové rafty, shluky receptorů na cytoplasmatické membráně a například prolaktinová sekreční granula, která jsou sice obklopená fosfolipidovou membránou, ale uvnitř těchto váčků se nachází dvě fáze, separované již v endoplazmatickém retikulu³⁵.



Obrázek 2: Příklady fázově separovaných organel v eukaryotické buňce; převzato z Gomes 201936, upraveno

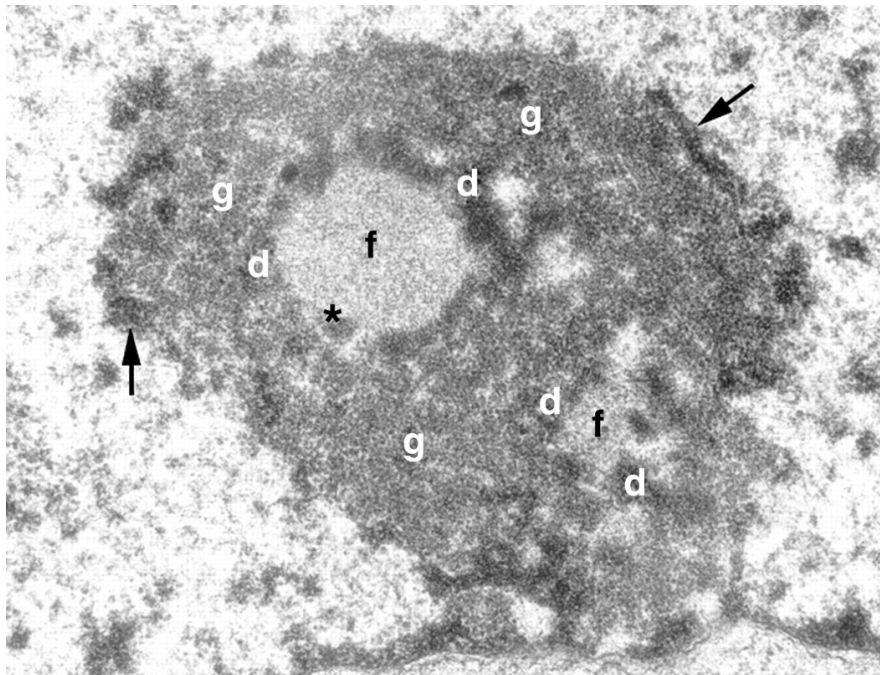
4.1 Jadérko (Nucleolus)

V jádře buňky se odehrává množství různorodých procesů, které je nutné od sebe prostorově odlišit a pokud vezmeme v potaz nepřítomnost membránových struktur uvnitř tohoto buněčného kompartmentu, nejsnazším způsobem, jak toho dosáhnout, je právě LLPS.

První z jaderných okrsků (nuclear bodies), který byl pozorován již v první polovině 19. století je jadérko. Představy o jeho stavbě a funkci se v minulosti vyvíjeli společně s metodami umožňujícími jeho zkoumání. Dnes víme, že se morfologicky dělí do tří oblastí: fibrilární centrum (FC), denzní fibrilární komponent (DFC) a granulární komponent (GC). FC obsahuje jako jediná ze tří částí DNA, především pak tandemové repetice genů pro pre-rRNA. DFC je místem, kde dochází k prvním úpravám pre-rRNA a v GC můžeme pozorovat preribozomální partikule a finální úpravy pre-rRNA (Obrázek 3). Jadérko, jako celek, má přibližně jen dvojnásobnou celkovou koncentraci proteinů v porovnání s okolní nukleoplazmou³⁷ a obsahuje kolem 350^{38,39} různých druhů proteinů nutných pro zajištění všech jejích funkcí.

Kromě vytváření a úprav rRNA a sestavování ribozomů se jadérko uplatňuje i v sestavení SRP (signal recognition particle)¹⁷, regulaci buněčného cyklu pomocí zadržování nucleosteminu⁴⁰ a nejspíš má vliv i na funkci telomerázy a syntézu tRNA⁴¹.

V průběhu mitózy se jadérko rozpouští a po rozdělení znovu vzniká kolem organizátorů jadérka. V procesu tvorby jednotlivých kompartmentů hrají významnou roli proteiny fibrillarin (pro vznik DFC) a nucleophosmin (pro vznik GC), které působí jako lešení pro oddělení jednotlivých kapalných fází. U obou zmíněných proteinů bylo prokázáno, že podporují fázovou separaci in vitro^{42,43}.



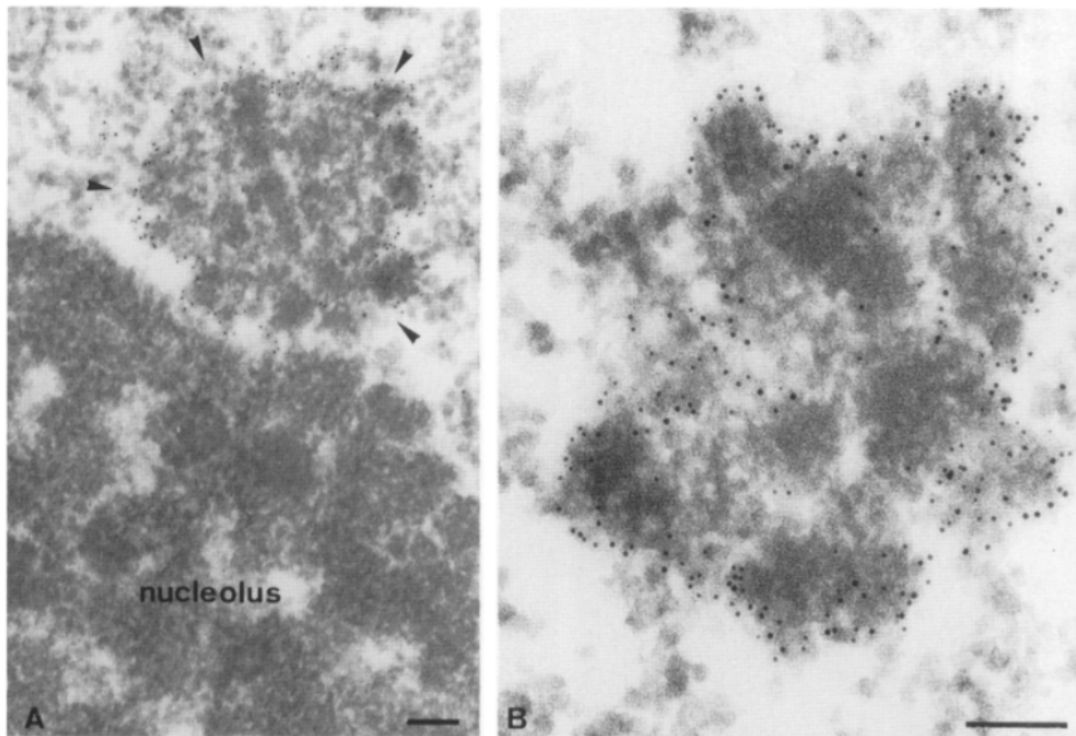
Obrázek 3:
Elektronmikroskopický
snímek nucleolu z
myšího fibroblastu,
(f) fibrilární centrum,
(d) denzní fibrilární
komponent,
(g) granulární
komponent,
(šipky) perinukleolární
heterochromatin,
(*) označuje
přítomnost denzního
fibrilárního
komponentu uvnitř
fibrilárního centra;
převzato z Raška,
2003⁴⁴, upraveno

4.2 Cajalova tělíska (coiled bodies)

Cajalova tělíska nebo také coiled bodies jsou druhou nejlépe prozkoumanou organelou buněčného jádra objevenou již roku 1903 R. Cajalem, který je pojmenoval jako přídatná tělíska jadérka. Vyskytují se v počtu 1 až 5 na buňku, mají zhruba sférický tvar, 300 – 500 nm v průměru (v oocytu až 100 kopií s velikostí v řádu mikrometrů). Obsahují elektron densní zkroucená vlákna (coiled threads) mající průměr kolem 40 – 60 nm, která váží stříbro (Obrázek 4). V průběhu času byly mnohokrát znovuobjeveny a zapomenuty a mnohokrát znovupojmenovány – právě po identifikaci elektronovým mikroskopem byly nazvány coiled bodies podle obsahu denzních spirálovitých struktur⁴⁵.

Charakteristickým proteinem pro coiled bodies, který tvoří lešení pro zformování organely je P80/coilin^{20,21}. Bylo prokázáno, že při nesprávné fosforylaci tohoto proteinu ať už přidáním specifického inhibitoru Ser/Thr fosfatázy, kyseliny okadaové, nebo mutacemi na určitých místech proteinu (např. výměnou S202 za aspartát) se Cajalova tělíska netvoří a jejich komponenty včetně samotného coilinu lze nalézt například v jadérku⁴⁶. Míra fosforylace se liší i v průběhu buněčného cyklu, což umožňuje rozpuštění tělíska v profázi mitozy⁴⁷ a jeho znovuzformování v druhé polovině G1 fáze.

Samotná Cajalova tělíska bývají často doprovázena dalšími proteinovými kapénkami nazývanými cleavage bodies podle obsahu Cst64 (cleavage stimulation factor 64) a CPSF100 (cleavage and polyadenylation specificity factor 100)⁴⁸.



Obrázek 4: Cajalovo tělísko poblíž jadérka (A) a samostatně (B), měřítko 0.1 μm , převzato z Carmo-Fonseca et al. 1993⁴⁷

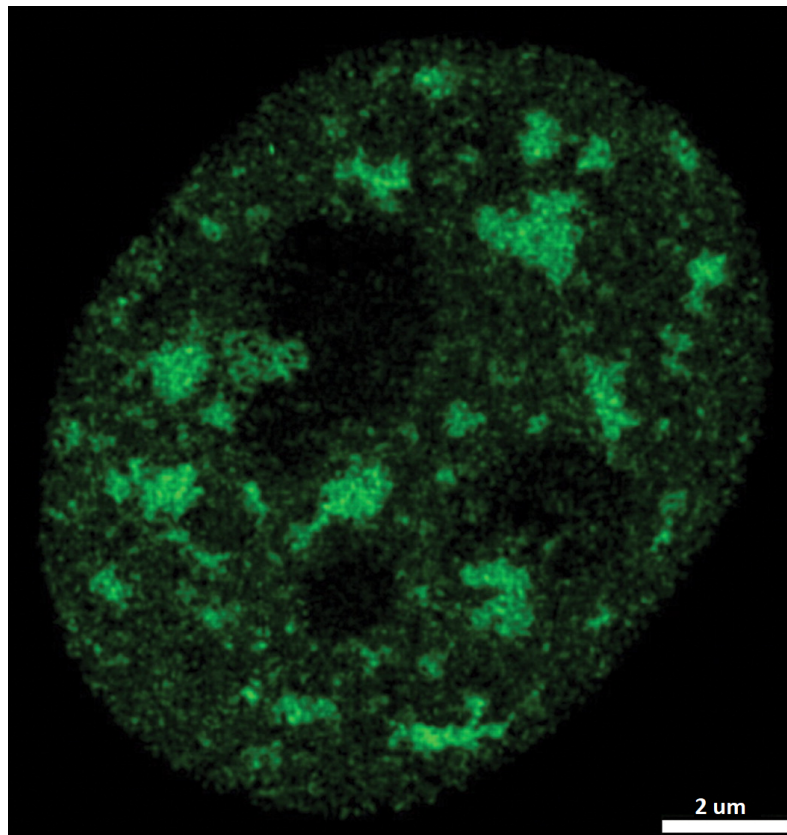
4.3 Speckles (Interchromatin Granule Clusters):

Speckles jsou interchromatinové shluky s variabilní velikostí složené z 20 – 25nm granulí propojených tenkými vlákny⁴⁹, jejichž velikost a počet závisí na transkripční aktivitě buňky (Obrázek 5). Zároveň jsou další organelou objevenou R. Cajalem, tentokrát ale v roce 1910 pomocí barvení kyselým anilinem¹². Jejich objevitel je pojmenoval jako „grumos hialinas“ neboli průsvitné shluky a jejich označení jako speckles (flíčky) se poprvé objevuje v roce 1961⁵⁰, krátce po jejich identifikaci v elektronovém mikroskopu⁴⁴.

Funkcí speckles je ukládání, sestavování a modifikace faktorů potřebných pro zpracování nascentní mRNA, ne však samotný splicing, který nejspíše společně s polyadenylací probíhá v přidružených perichromatických fibrilách⁵³.

Obsahují množství pre-mRNA splicing faktorů jako například různé snRNP a SR proteiny (SC35 a další)⁵¹, jejich kinázy⁵² a fosfatázy⁵³. Dále pak transkripční faktory (např. podjednotka RNA polymerázy II pol Ilo⁵⁴), poly-A polymerázu⁵⁵ nebo dokonce eIF4E⁵⁶.

SON protein vytváří lešení organely, přičemž pokud dojde k zablokování jeho syntézy pomocí RNA interference, organela nevzniká a dochází k zastavení buněčného cyklu v metafázi⁵⁷.



Obrázek 5: Jádru HeLa buňky s proteinem SC35-EYFP (zelená) identifikujícím speckles; převzato z Spector, Lamond 2011⁵⁸, upraveno

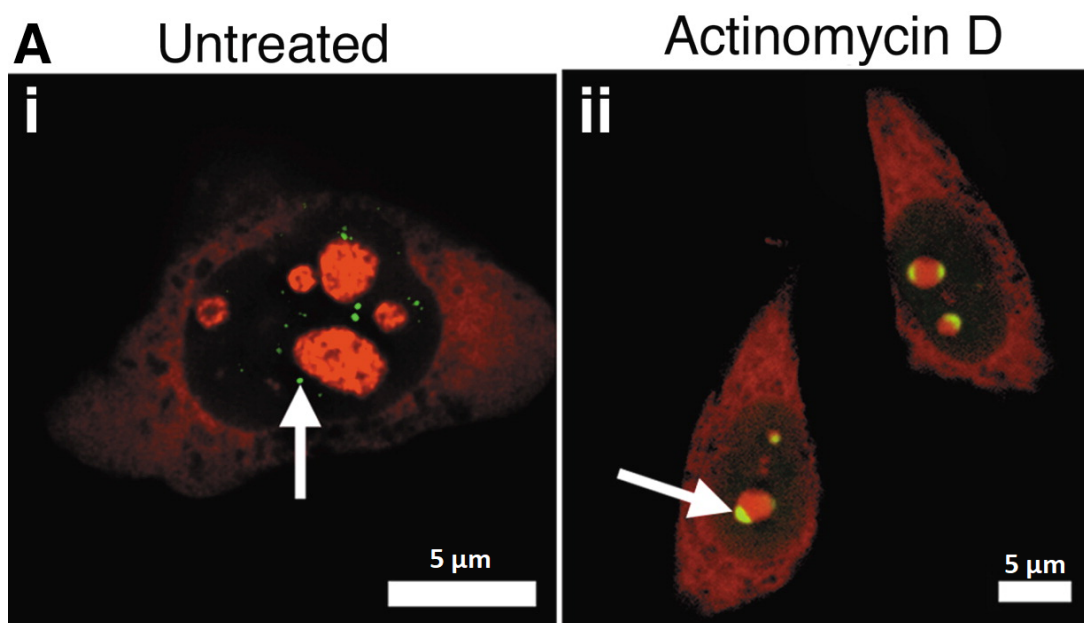
4.4 Paraspeckles

Přítomnost paraspeckles v jádře byla zaznamenána až v roce 2002 Foxem⁵⁹, který byl schopen kolokalizovat Paraspeckle Protein 1 (PSP1), PSP2 a p54/nrb do interchromatinových tělísek o velikosti 0,5 – 1 μm . Vyskytují se zpravidla v počtu 5 – 20 v jádrech savců.

Pro vznik organely je nutná přítomnost lncRNA Men ϵ (dlouhá nekódující RNA Men ϵ , někdy také jako NEAT1) a lncRNA Men β ^{60,61}, které slouží jako nukleační faktor, na který se váží proteiny rodiny DBHS vyznačující se coiled-coil doménou a RNA vážícími motivy. DBHS proteiny PSF a p54/nrb jsou nutné pro zformování organely, PSP1 je pak vhodný pro její značení, protože má nízkou koncentraci v ostatních částech jádra. Paraspeckles také obsahují inaktivní formu RNA polymerázy II⁶².

Hlavní dosud známou funkcí organely je zadržování určitých typů RNA v jádře. Příkladem takové RNA je - pro myši specifická - Ctn⁶³, která má všechny exony nutné pro tvorbu CAT2 proteinu (cationic amino acid transporter 2) a poly-A konec. V porovnání s jádrem opouštějící a translatovanou RNA z genového lokusu *mCAT2*, má ale prodloužený 3' UTR, který obsahuje invertované repetice a tvoří dvojvláknovou strukturu, kterou rozeznává dsRNA-dependentní adenosin deamináza, která katalyzuje přeměnu adenosinu na inosin⁶⁴. Zvýšené zastoupení inosinu v RNA pak umožňuje vazbu na DBHS proteiny a dočasně tak znemožní export Ctn do cytoplasmy.

Zajímavé je, že při zastavení transkripce aktinomycinem D dochází k rozpuštění paraspeckles. Důvodem je inaktivace RNA polymerázy II a tím zastavení produkce Men ϵ/β . V takovém případě se DBHS proteiny přesouvají do oblastí poblíž jadérka zvaných perinukleolární čepičky (Obrázek 6).



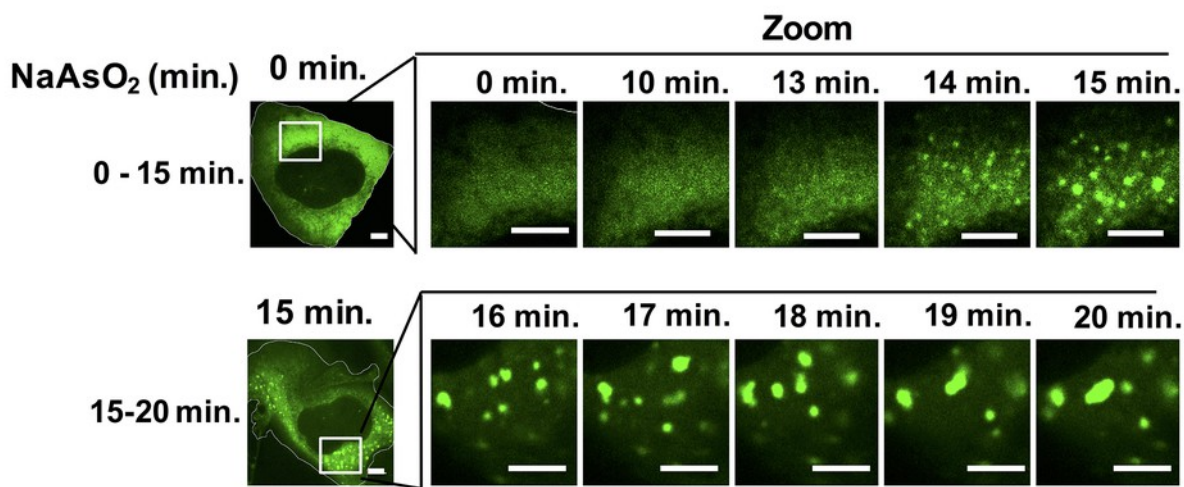
Obrázek 6: Fluorescenční mikrogram HeLa buněk před (i) a po (ii) aplikaci aktinomycinu D, popisuje přesun PSP1 do perinukleárních čepiček; barvení: Pyronin Y (červená, zobrazuje RNA), YFP-PSP1 fluorescence (zelená); převzato z Fox 2002⁵⁹, upraveno.

4.5 Stresová granula

Stresová granula jsou cytozolické 0,1 - 2 μm organely mající denzní jádro (core) a méně koncentrovanou obálku (shell)^{25,65}. Rozlišujeme mnoho různých typů lišících se složením, podmínkami vzniku a typem buněk⁶⁶, ve kterých vznikají. Obsahují zpravidla polyadenylované RNA i ve formě preiniciačních komplexů (s navázanou 40S podjednotkou ribozomu), poly(A)vážíci protein (PABP), T-lymfocytární vnitrobuněčný antigen 1 (TIA1)^{67,68} a další RNA vážíci proteiny v závislosti na povaze granula^{66,69}.

Jsou tvořeny v odpovědi na náhlou změnu podmínek v okolí buňky jako je například tepelný šok, osmotický šok nebo náhlé zvýšení koncentrace NaAsO_2 (Obrázek 7) a jejich přítomnost v cytoplazmě úzce souvisí s aktivitou translace. Hlavní biochemické dráhy regulující vznik stresových granul zahrnují inaktivaci mTOR (mamalian Target Of Rapamycin) a fosforylaci eIF2 α ⁶⁷, rozpouštění je pak způsobeno obnovením translace typu mRNA soustředěného v granulu nebo autolyzozomální kaskádou. Chronický stres působící na buňku nebo nefunkčnost autolyzozomální kaskády pak vede ke stabilizaci stresových granul a tvorbě pevných agregátů (přehledně shrnuto Wolozinem⁷⁰).

Organela se účastní metabolismu mRNA, kontroly translace, třídění mRNA-proteinových částic a slouží jako dočasné úložiště pro různorodé molekuly cytoplazmy. V posledních letech se také ukazuje úzká souvislost mezi dynamikou těchto organel a širokým spektrem nemocí, jmenovitě pak amyotrofickou laterální sklerózou, frontotemporální demencí, Alzheimerovou chorobou, některými formami rakoviny⁷¹ a množstvím virových infekcí.



Obrázek 7: Formování stresových granul v U-2 OS buňkách exprimujících GFP-G3BP1 v reakci na stres vyvolaný NaAsO_2 , velikost měřítka je 5 μm , převzato z Wheeler 2016²⁵, upraveno

Tabulka 1: Seznam vybraných bezmembránových organel, jejich funkce a složky

Název organely	Hlavní funkce	Charakteristický protein
Heterochromatin ⁷²	Regulace transkripce	HP1, H3 metylovaný na K9
Nucleolus	Syntéza ribosomů	fibrillarin, nucleophosmin, RNA polymeráza I
Cajalova tělíska	Biogeneze, maturace a recyklace snRNP	coilin
Cleavage bodies ⁷³	Akumulace sestřihových faktorů	Cst64 a CPSF100
Gemini of coiled bodies ⁷³	Akumulace snRNP a snoRNP pro modifikaci RNA	SMN protein
Clastosome ⁷⁴	Akumulace proteasomů a ubiquitinylovaných proteinů	19S a 20S proteasom
Speckles	ukládání, sestavování a modifikace sestřihových faktorů	SON, PTB I, SRSF2, SRSF1, Malat1
Paraspeckles	Regulace exportu RNA z jádra	PSP1, P54NRB, PSF
Promyelocyticko-leukemická tělíska (PML bodies) ⁷⁵	Opravy DNA, regulace transkripce	PML
DDX1 Bodies ⁷³	Akumulace DDX1	DDX1
Komplex jaderného póru ⁷⁶	Regulace transportu molekul mezi jádrem a cytoplasmou	nukleoporiny
Stresová granula	Odpověď na stres	FUS, eIF4G2, Pub1, HNRNPA1, TIA-1 a další
P granulum ⁷⁷	Determinace germinální linie	LAF-1
P tělíska (processing bodies) ⁷⁸	Translační represe a degradace mRNA	Dcp1a, Lsm proteiny
Ribosom ⁷⁹	Translace mRNA	ribosomální proteiny
Postsynaptické denzity ⁸⁰	Modulace synaptického signálu	SynGAP a PSD-95
Neuronová transportní granula ⁷⁸	Transport mRNA v neuronech	Staufen1 a 2, FMRP, ZBP1, hnRNP A2, CPEB, Purα, SMN
Nuage ⁸¹	Potlačení aktivity transpozónů	MAEL, MIWI2, Ddx4,..
Buněčné inkluze	Dočasné úložiště	různý

5. Neurodegenerativní choroby a virové infekce ve vztahu k bezmembránovým organelám

Bezmembránové organely jsou součástí mnoha buněčných procesů a poruchy jejich funkcí mají přímý vliv na fitness organismu. Nejčastější lidské nemoci spojované s těmito organelami jsou neurodegenerativní choroby a virové infekce. Charakteristickými projevy těchto nemocí mohou být úplná absence, zvětšování, zmnožení a především pak - u neurodegenerativních onemocnění - přetrvávání těchto organel, snižování jejich permeability a následná solidifikace. Příčinou změn ve struktuře organel bývají neobvyklé koncentrace RNA a proteinů, změny ve struktuře proteinů způsobené mutací v DNA nebo přítomnost cizorodých látek.

Neurodegenerativní choroby uváděné v souvislosti s bezmembránovými organelami bývají definované svými projevy a mívají proto více, často nespojujících, příčin. Příklady mohou být amyotrofická laterální skleróza, Alzheimerova choroba nebo Frontotemporální demence.

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je smrtelná, neléčitelná choroba charakterizována rychle postupujícím úbytkem mozkových i míšních motoneuronů vedoucí ke ztrátě pohyblivosti a atrofii svalů v řádu několika málo let. V mnoha zaznamenaných případech dochází k poruchám tvorby a lokalizace proteinu TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43)⁸², ubiquitin⁸³ nebo superoxid dismutasy 1 (SOD1)⁸⁴, tyto proteiny se následně koncentrují v bezmembránových kapénkách které postupně přeměňují na pevné agregáty.

Alzheimerova choroba představuje nejčastější typ ztráty kognitivních schopností u lidí nad 65 let. Mezi její projevy patří ztráta a pokřivení paměti, zhoršení jazykových schopností, obtížná orientace a poruchy chování. Jednou z příčin této choroby je zvýšení koncentrace amyloidu β v korových neuronech mozku a následné ukládání tohoto proteinu v kapénkách, které mají tendenci solidifikovat na amyloidové plaky. Zvýšení koncentrace amyloidu β způsobí hyperfosforylaci Tau proteinu, ta má za následek narušení mikrotubulárního cytoskeletu a smrt nervových buněk⁸⁵.

Efekty virových infekcí jsou především popisovány na stresových granulích. Například Herpesviridae a Flaviviridae zabírají tvorbu stresových granulí^{86,87}. Poxviridae přesouvají translační faktory nashromážděné ve stresových granulích do cytoplasmy, kde je využívají pro syntézu svých vlastních proteinů⁸⁸ a přenosný gastroenteritický virus (TGEV) z čeledi Coronaviridae naopak podporuje vznik těchto organel⁸⁹. Virové infekce obecně upravují metabolismus buňky ve svůj vlastní prospěch a narušují tím křehkou rovnováhu buněčných procesů, což má za následek poruchy funkce buněčných organel. Přehledně shrnuto v Gaete-Argel 2019⁹⁰.

6. Metody výzkumu bezmembránových organel

V posledních zhruba 20 letech stále stoupá zájem o bezmembránové organely a objevuje se čím dál tím více nových a přesnějších informací o jejich funkci a buněčné lokalizaci. Tento trend je způsoben především kvalitnějšími přístroji a inovativními metodami schopnými identifikovat rozrůstající se množství jejich typů a komponent.

6.1 Mikroskopie

Světelná mikroskopie, elektronová mikroskopie a mikroskopie atomárních sil (AFM) se všechny uplatňují při studiu biomolekulárních kondenzátů. Mikroskopie atomárních sil je vhodná ke studiu gelových a pevných agregátů, elektronová mikroskopie umožňuje pozorovat organely pod vysokým rozlišením. Světelná mikroskopie nám jako jediná dává možnost pozorovat přítomnost a dynamiku organel v živých buňkách.

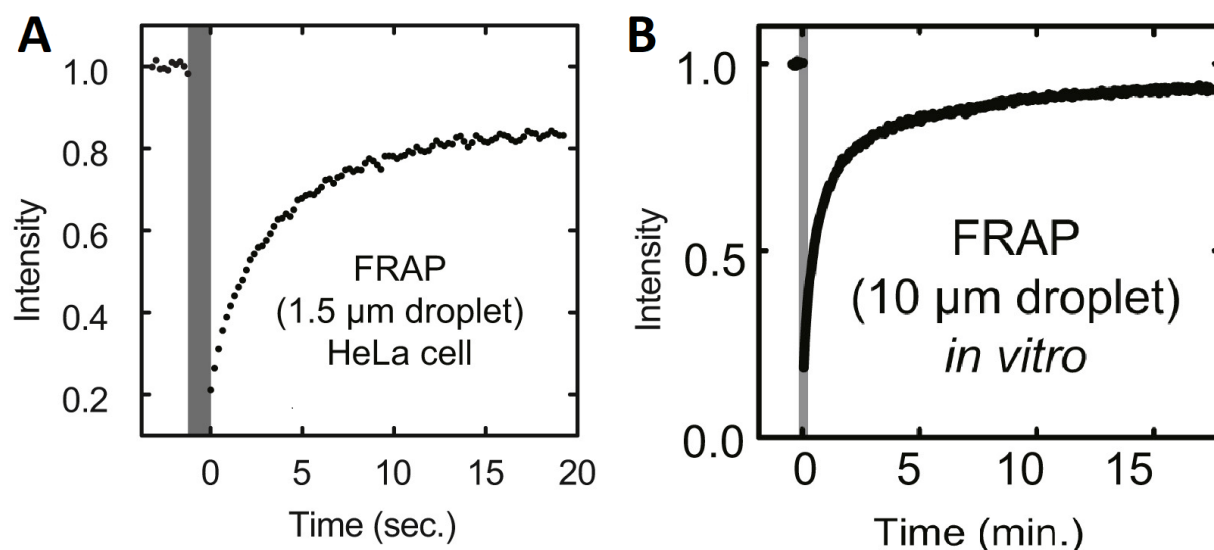
Světelná mikroskopie je velice stará metoda používaná již v 17. století. Pomocí této metody byly učiněny první pozorování jaderka^{8,9} nebo například, po obarvení kyselým anilinem, speckles¹². Jejím principem je osvětlení vzorku světlem a zachycení záření od něj odraženého, jím rozptýleného nebo emitovaného. Dnes existuje mnoho typů této metody a stále se objevují další. Pro zkoumání bezmembránových organel je nejdůležitější fluorescenční mikroskopie a Nomarského varianta mikroskopie fázového kontrastu.

Vždy při přímém ozáření vzorku je ale nutné brát v úvahu, že může docházet ke světlem indukovanému provázání (crosslink, především u RNA a RNA vazebných proteinů) a tak experimentálně indukovanému vytvoření gelu³⁴.

Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je ideálním nástrojem pro sledování lokalizace a dynamiky proteinu in vivo a in vitro. Jejím základem je osvětlení vzorku zářením o definované vlnové délce, tím excitace fluoroforu v něm obsaženém a následná detekce záření emitovaného. Molekuly proteinů samy o sobě nefluoreskují, proto je nutné vytvořit rekombinantní protein obsahující značku, která by toho byla schopna, bohužel tato značka neboli tag může měnit vlastnosti molekuly a je nutné jí do molekuly pečlivě umístit. Při studiu schopnosti proteinu fázově separovat (tvořit samovolně místa o vyšší koncentraci) a lokalizovat do fázově separovaných kompartmentů vytvořených za přispění jiných molekul se často značí jen část populace proteinu obsažené v buňce tak, aby jeho funkce byla ovlivněna co možná nejméně. Tato metoda se uplatňuje i při studiu splývání kapének. Nejpoužívanější fluorescenční značkou je zelený fluorescenční protein (GFP) a jeho modifikace.⁹¹

Obnovení fluorescence po vybělení světlem (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP)⁹² a komplementární metoda, ztráta fluorescence světelným vybělením (Fluorescence Loss In Photobleaching, FLIP)⁹³, představují možnosti sledování pohybu proteinů mezi buněčnými kompartmenty. Základem obou metod je intenzivní osvětlení určité oblasti buňky, ve které dojde k permanentní inaktivaci fluoroforu. Následně při FRAP sledujeme za jak dlouho a jestli vůbec se obnoví fluorescence v této oblasti (Obrázek 8) a při FLIP sledujeme, zdali se v průběhu osvětluování mění intenzita fluorescence v okolí námi vybrané části buňky. Touto oblastí může být například organela, část organely nebo část nukleoplasmu²². Metody lze použít například i pro pozorování pohybu molekul v buněčných membránách⁹². Pokud pozorujeme lokální zvýšení koncentrace proteinu a rychlou výměnu (rychlé obnovení fluorescence při FRAP a rychlý úbytek fluorescence při FLIP) v této oblasti, můžeme naše pozorování považovat za jeden z důkazů vytvoření biomolekulárního kondenzátu. Stejnou dynamiku pozorujeme ale i u proteinů, které se reverzibilně váží do porovitých pevných struktur.



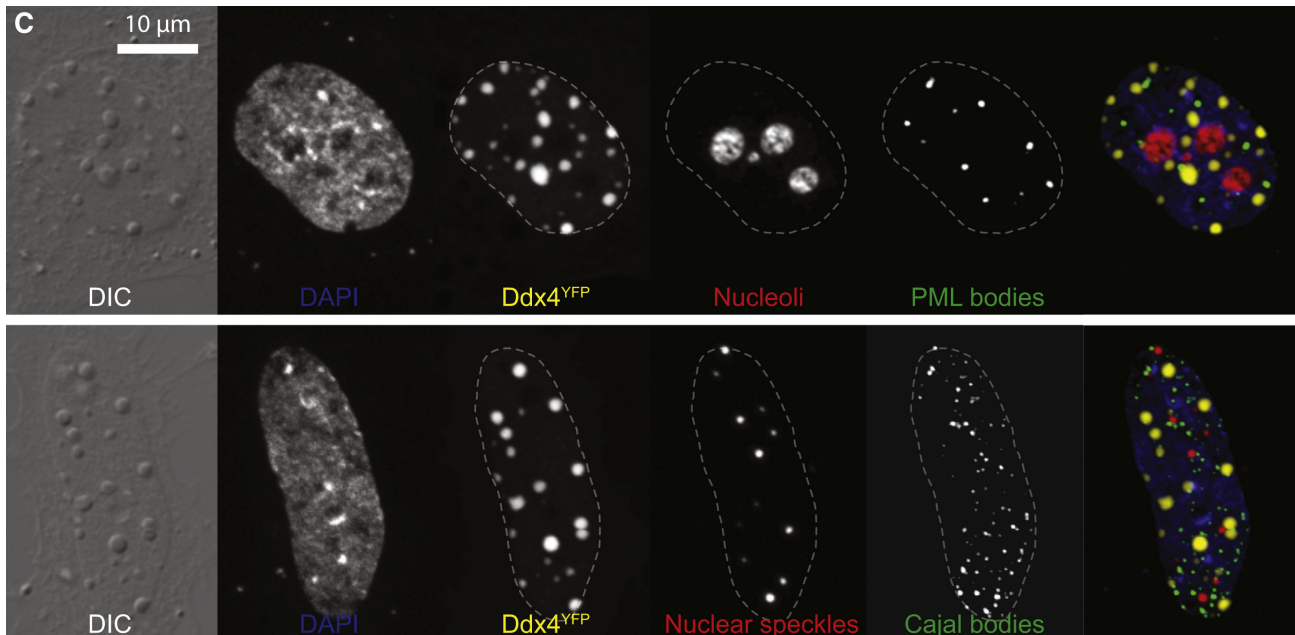
Obrázek 8: Intenzita fluorescence kapénky v závislosti na čase po jejím vybělení. Šedé pole označuje dobu osvětluování, převzato z Nott et al. 2015⁹⁵, upraveno

A: Ddx4^{YFP} kapénky v živé HeLa buňce, průměr 1,5 μm, 37°C. 50 % intenzity fluorescence se navrácí za 2.5 s po osvětlení

B: *in vitro* kapénka obsahující Ddx4^{N1} a rekombinantní purifikovaný Ddx4YFP v poměru 60:1, průměr 10 μm, v roztoku 150mM NaCl, 20°C. 50 % intenzity fluorescence se navrácí za 1 min po osvětlení

Nomarského diferenciální interferenční kontrast

Nomarského diferenciální interferenční kontrast (Differential interference contrast, DIC) představuje způsob, jak pozorovat morfologii buněčných organel bez použití barvení, které by mohlo měnit strukturu kondenzátů (Obrázek 9). Metoda je založená na interferenci dvou paprsků polarizovaného světla ze stejného zdroje rozdělených polopropustným zrcadlem. První paprsek prochází vzorkem a rychlost jeho šíření je ovlivněna indexem lomu jednotlivých částí vzorku, druhý paprsek slouží jako referenční. Po průchodu vzorkem se paprsky skládají a intenzita výsledného záření je závislá na fázi obou paprsků, pokud se nachází ve stejné fázi, intenzita je nejvyšší a s lišící se fází, intenzita klesá. Díky tomu jsme schopni rozlišit jednotlivá prostředí v buňce s různými indexy lomu světla⁹⁴.



Obrázek 9: Porovnání informací získaných z Nomarského varianty mikroskopie fázového kontrastu (DIC) a fluorescenční mikroskopie na příkladu jader HeLa buněk; převzato z Nott et al. 2015⁹⁵, upraveno

6.2 Metody používané *in vitro*

Převedení organel do definovaného prostředí umožňuje přesnější definici jejich složení a podmínek, ve kterých dochází k jejich formování. Vždy je ale nutné mít na paměti, že v různých prostředích mohou makromolekuly tvořící kapénky vykazovat různé vlastnosti a také fakt, že pokud se *in vitro* vytváří fázové rozhraní, nelze říci, že se tak děje také *in vivo* nebo že má tento proces v buňce nějakou funkci. Mezi metody používané *in vitro* patří také mikroskopie zmíněná v předchozí podkapitole.

Přenesení organel do *in vitro* prostředí

Bezmembránové organely můžeme v bezbuněčném roztoku získat extrakcí celých organel z živých buněk nebo izolací jednotlivých komponent a jejich zpětným zformováním. Zatímco extrakce celých organel zpravidla zahrnuje lyzi buněk, centrifugaci a imunoprecipitaci^{96,97,98,99}, při izolaci jednotlivých, většinou rekombinantních, proteinů a různých nukleových kyselin je nutné brát v potaz použitý expresní systém, tendenci proteinů agregovat a vázat se na použité materiály, použité pufrы a veškeré modifikace proteinů a nukleových kyselin (značky, delece, metylace,..) a jejich dopad na průběh purifikace. Výsledkem je pak čistý protein, u kterého jsme schopni přesně určit podmínky za kterých se fázově separuje, zdali je vůbec schopen se samostatně separovat a vlastnosti takto vzniklého kondenzátu³⁴.

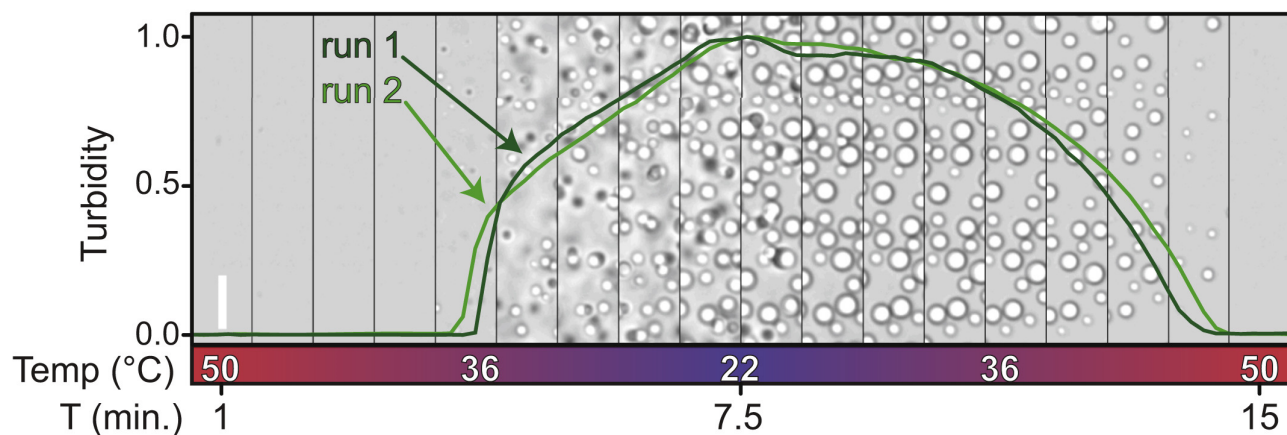
Samotná fázová separace by měla probíhat ve fyziologických podmínkách se zvýšeným důrazem na vhodnou teplotu, pH a koncentraci solí. Ochotu proteinů se separovat může ovlivnit i kvalita povrchu použitých nádob a přítomnost srážedel (crowding agents), jako jsou polyethylenglykol, ficoll nebo dextran¹⁰⁰.

Stanovení koncentrace proteinů v kapénkové fázi

Spolehlivou metodou určování koncentrace kapénkové fáze v čistém roztoku jediného proteinu je oddělení obou přítomných fází centrifugací a změření absorbance při $\lambda = 280$ nm. Po centrifugaci je vhodné dispergovanou fázi definovaně naředit za účelem zamezení vzniku dalších kondenzátů v průběhu měření¹⁰¹. Další možností jak stanovit koncentraci proteinu v kapénce může být například použití fluorescenčně značených molekul a následná kvantitativní analýza intenzity emitovaného světla. V tomto případě je nutné mít k dispozici kalibrační křivku popisující intenzitu emitovaného světla použitým fluoroforem ve vztahu k jeho koncentraci¹⁰².

Měření turbidity

Kapénky o rozměrech v řádu desítek a stovek nanometrů mají schopnost rozptylovat viditelné světlo a mohou tak být detekovány měřením optické denzity roztoku nebo měřením statického rozptylu světla. Tato metoda tak dovoluje určit kritické hodnoty parametrů, při kterých jsou kapénky vytvořeny, neposkytuje však informaci o jejich složení (Obrázek 10). Metodu je tedy vždy nutné kombinovat například s fluorescenční mikroskopií, aby bylo možné prohlásit, že se v kapénkách skutečně nachází zkoumaný protein.



Obrázek 10: Měření turbidity (zelené křivky) *in vitro* kapének Ddx4 proteinu (202 μ M protein, 200 mM NaCl) s měnící se teplotou doplněné o mikroskopické pozorování vzniku a zániku kapének, Turbidity = turbidita, Temp = teplota ve $^{\circ}$ C, T = čas v minutách, převzato z Nott et al. 2015⁹⁵, upraveno

Měření povrchového napětí

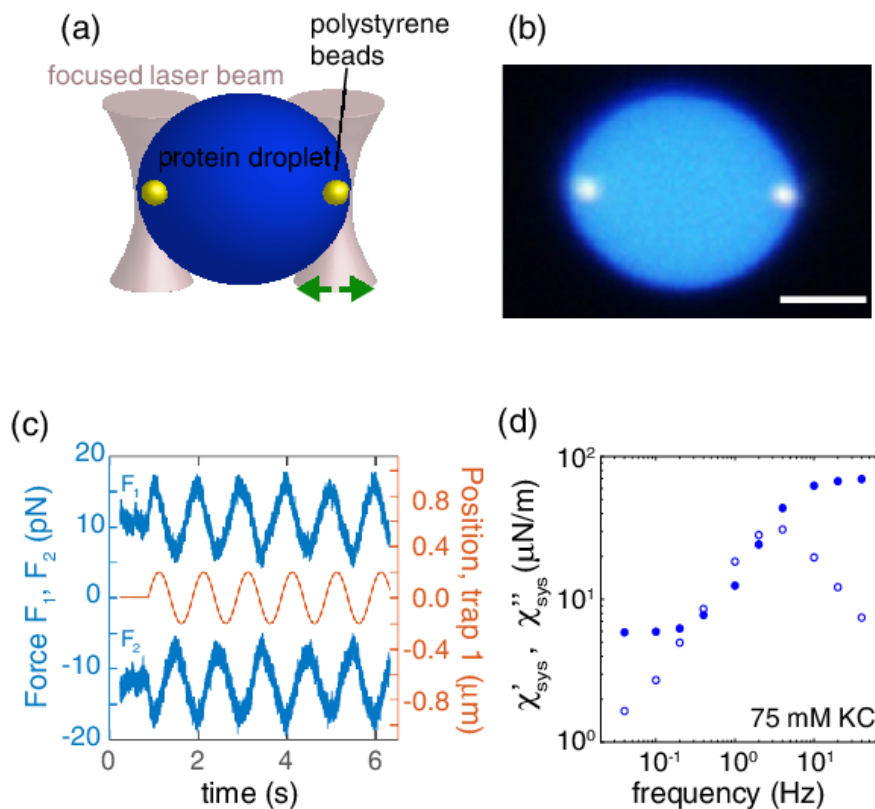
Povrchové napětí kapének lze stanovit usazením na hladký pevný podklad (sklíčko,...) a změřením úhlu mezi povrchem kapénky a rovinou podkladu. Další možností může být odvození povrchového napětí z hodnot viskozity naměřených pasivní mikoreologií a z tzv. inverse capillary velocity, což je poměr viskozity k povrchovému napětí, který lze získat porovnáním rychlosti splývání kapének a jejich rozměrem¹⁰².

Mikroreologie

Mikroreologie představuje soubor metod zaměřených na zkoumání viskozity a elasticity kapalin. Metoda pasivní mikroreologie spočívá ve vložení inertní částice s velikostí v řádu mikrometrů do centra kapénky a mikroskopickém sledování jejího pohybu skrz organelu. Výsledkem pozorování je vzdálenost, kterou částice urazí za daný čas (z této hodnoty se následně dá vypočítat viskozita kapénky) nebo stanovení frekvence se kterou částice v kapénce kmitá pomocí optické pasti, a tak i elasticita. Při aktivní mikroreologii je vložena částice zároveň s probíhajícím měřením rozkmitána na definovanou frekvenci optickou pastí nebo elektromagnetickým polem a zaznamenávány jsou odchylky od vyvolaných kmitů. Aktivní mikroreologie tak umožňuje přesnější stanovení elasticity¹⁰³.

Další variantou mikroreologie, volně kombinovatelnou s aktivním i pasivním uspořádáním, je dvoučásticová (two-particle) mikroreologie, kdy jsou do kapénky nezávisle vloženy dvě částice. Tato varianta umožňuje odfiltrout nežádoucí lokální vlivy prostředí v nejbližším okolí částice a poskytuje tak mnohem přesnější informaci o vlastnostech kapénky. Při aktivním uspořádání dvoučásticové varianty (Obrázek 11) je zpravidla rozkmitávána pouze jedna z částic a druhá slouží pro detekci¹⁰⁴.

Naměřené hodnoty jsou ovlivněny velikostí, tvarem částic a materiálem ze kterého jsou vyrobeny¹⁰⁵.



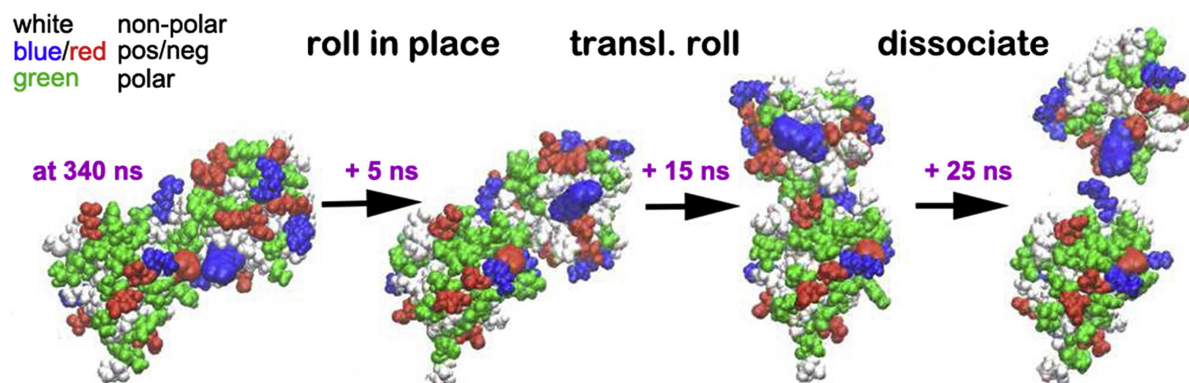
Obrázek 11: Aktivní dvoučásticová mikroreologie in vitro kapénky tvořené proteinem PGL-3, (a) Schéma, (b) fluorescenčně-mikroskopický snímek v průběhu pokusu, měřítko = 5 μm , (c) změna pozice optické pasti 1 (červeně) a síla, kterou působí jednotlivé částice na optickou past 1 a 2 v průběhu experimentu (d) vypočítané koeficienty pružnosti pro první (χ'_{sys} , plné kruhy) a druhou (χ''_{sys} , prázdné kruhy) optickou past, převzato z Jawerth et al. 2018¹⁰⁴, upraveno

6.3 Počítačové modely

Počítačové modely jsou dnes nejrychleji se rozvíjejícím souborem metod pro popis a především predikci chování nejrůznějších systémů a bezmembránové organely nejsou výjimkou. Pokud pomineme množství databází obsahující informace o konformaci proteinů (např. PDB, UNIPROT), dostáváme se k algoritmům pro predikci výskytu různých typů domén v závislosti na sekvenci aminokyselin a programům schopným předpovědět chování celých organel v závislosti na souboru jejich komponent.

Algoritmy pro predikci konformace proteinů mohou uvažovat pravděpodobnost výskytu určité aminokyseliny v různých typech sekundárních a terciálních struktur a na základě aminokyselinové sekvence jsou schopné vypočítat celkovou pravděpodobnost přítomnosti takové struktury v molekule (např. PLAAC pro predikci vnitřně neuspořádaných regionů¹⁰⁶). Dalším způsobem predikce může být porovnání vlastností jednotlivých reziduí (hydrofobicita, náboj,..) a vytvoření modelu konkrétního proteinu (Rosetta a další).

Předpovědět chování celé organely může být velmi náročné na výpočetní kapacitu, proto se často používá zjednodušený, hrubozrný (coarse-grained) model jejich komponent, který místo atomů, jako základních jednotek systému uvažuje zpravidla celá aminokyselinová rezidua nebo například celé báze nukleových kyselin¹⁰⁷. Pokroky v konstrukci výpočetní techniky ale umožňují v posledních několika letech použití mnohem detailnějších, „all-atom“ (Obrázek 12), modelů a přinášejí tak velmi přesný způsob, jak testovat vědecké hypotézy^{108,109}.



Obrázek 12: All-atom model procesu disociace SAM-SAM komplexu, barevně odlišeny aminokyselinová rezidua, nepolární (bílá), kladně nabitá (modře), záporně nabitá (červeně) a polární (zeleně); převzato z Zhang et al. 2016

7. Závěr

Bezmembránové organely jsou dynamické shluky proteinů a nukleových kyselin, které v buňce zastávají množství důležitých funkcí. Jsou kapalné, jsou od svého okolí odděleny fázovým rozhraním a jejich struktura je termodynamicky reverzibilní. Toto jsou tři základní a jediné charakteristiky společné pro všechny různé typy kapének, které za bezmembránové organely můžeme považovat. Výčet rozdílů mezi různými formami a druhy těchto shluků je ale mnohem delší. Liší se v druhu proteinu, RNA či dokonce DNA, kterou mohou obsahovat, liší se fyzikálními podmínkami, ve kterých se tvoří a ve kterých jsou schopné přetrvávat, liší se svým vzhledem, svou velikostí, svou funkcí a důvodem, pro který se v buňce tvoří a liší se podstatně dobou, po kterou jsou schopné v buňce přetrvat. Přes to všechno a tím vším jsou nezbytné pro přežití buňky, poskytují rychlou, účinnou, přesnou regulaci buněčných procesů a každá nepřesnost a chyba v jejich funkci může být pro celý organismus zcela fatální.

V posledních málo desítkách let se bezmembránovým organelám věnuje čím dál větší pozornost nejen díky významu, který mají v živých soustavách, ale také díky novým a přesnějším možnostem jejich výzkumu. Rozvoj mikroskopických technik umožňuje sledovat pohyb jednotlivých molekul v kontextu žijící buňky a rozvoj výpočetní techniky už nyní nabízí způsoby jak toto chování předpovídat.

Ve své práci se pokouším nastínit současný pohled na bezmembránové organely. V poslední době se objevuje vzrůstající zájem o toto téma a dochází ke konsolidaci pozorování z různých oborů, což má za následek hlubší pochopení problému a rozpoznání nových souvislostí. Snad již dnes se dá říci, že tento přístup má potenciál v budoucnu přinést možnosti, jak efektivně ovlivňovat fázovou separaci *in vivo* a tím modulovat mnoho esenciálních buněčných procesů a eventuálně umožnit léčbu dnes smrtelných onemocnění.

Zdroje

1. BRONSTED, J. N. Solubility relations of high molecular weight substances. *CR Lab. Carlsberg*, 1938, 22: 99. (sekundární citace)
2. BRÖNSTED, J. N.; VOLQVARTZ, K. Solubility and swelling of high polymers. *Transactions of the Faraday Society*, 1939, 35: 576-579.
3. MEYER, K. H. Properties of Polymers in Solution: Statistical Interpretation of the Thermodynamic Properties of Binary Liquid Systems. *Helv. Chim. Acta*, 1940, 23: 1063. (sekundární citace)
4. FLORY, Paul J. Thermodynamics of high polymer solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 1941, 9.8: 660-660.
5. HUGGINS, Maurice L. Some properties of solutions of long-chain compounds. *The Journal of Physical Chemistry*, 1942, 46.1: 151-158.
6. FLORY, Paul J. Thermodynamics of heterogeneous polymers and their solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 1944, 12.11: 425-438.
7. ESCOBEDO, Fernando A.; DE PABLO, Juan J. Chemical potential and equations of state of hard core chain molecules. *The Journal of chemical physics*, 1995, 103.5: 1946-1956.
8. WAGNER, Rudolph. Einige bemerkungen und fragen über das keimbläschen (vesicular germinativa). *Müller's Archiv Anat Physiol Wissenschaft Med*, 1835, 268: 373-7. (sekundární citace)
9. VALENTIN, Gabriel. Repertorium für anatomie und physiologie. 1837. (sekundární citace)
10. MONTGOMERY JR, Tho SH. Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus. *Journal of Morphology*, 1898, 15.2: 265-582.
11. CAJAL, S. Ramón, et al. Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmatico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab. Lab. Invest. Biol. (Madrid)*, 1903, 2: 129-221. (sekundární citace)
12. Y CAJAL, Santiago Ramón. *El núcleo de las células piramidales del cerebro humano y de algunos mamíferos*. 1910. (sekundární citace)
13. HEITZ, Emil. Nukleolen und chromosomen in der Gattung Vicia. *Planta*, 1931, 15.3: 495-505. (sekundární citace)
14. MCCLINTOCK, Barbara. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea mays. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 1934, 21.2: 294-326.
15. CARMO-FONSECA, Maria, et al. Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. *The EMBO Journal*, 1991, 10.1: 195-206.

16. MILLER, O. L.; BEATTY, Barbara R. Visualization of nucleolar genes. *Science*, 1969, 164.3882: 955-957.
17. JACOBSON, Marty R.; PEDERSON, Thoru. Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95.14: 7981-7986.
18. FANG, Guowei; CECH, Thomas R. Telomerase RNA localized in the replication band and spherical subnuclear organelles in hypotrichous ciliates. *The Journal of cell biology*, 1995, 130.2: 243-253.
19. MATERA, A. Gregory; WARD, David C. Nucleoplasmic organization of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells. *The Journal of Cell Biology*, 1993, 121.4: 715-727.
20. RAŠKA, Ivan, et al. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Experimental cell research*, 1991, 195.1: 27-37.
21. ANDRADE, L. E., et al. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *The Journal of experimental medicine*, 1991, 173.6: 1407-1419.
22. PHAIR, Robert D.; MISTELI, Tom. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 2000, 404.6778: 604-609.
23. PEDERSON, Thoru. Diffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium. *Nature cell biology*, 2000, 2.5: E73-E74.
24. TANAKA, Toyochi; ISHIMOTO, Coe; CHYLACK, Leo T. Phase separation of a protein-water mixture in cold cataract in the young rat lens. *Science*, 1977, 197.4307: 1010-1012.
25. WHEELER, Joshua R., et al. Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *Elife*, 2016, 5: e18413.
26. MURRAY, Dylan T., et al. Structure of FUS protein fibrils and its relevance to self-assembly and phase separation of low-complexity domains. *Cell*, 2017, 171.3: 615-627. e16.
27. RIBACK, Joshua A., et al. Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response. *Cell*, 2017, 168.6: 1028-1040. e19.
28. SHIN, Yongdae; BRANGWYNNE, Clifford P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*, 2017, 357.6357: eaaf4382.
29. BANANI, Salman F., et al. Compositional control of phase-separated cellular bodies. *Cell*, 2016, 166.3: 651-663.
30. LI, Piong, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, 2012, 483.7389: 336-340.

31. WEBER, Stephanie C. Sequence-encoded material properties dictate the structure and function of nuclear bodies. *Current opinion in cell biology*, 2017, 46: 62-71.
32. HOFWEBER, Mario; DORMANN, Dorothee. Friend or foe—Post-translational modifications as regulators of phase separation and RNP granule dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294.18: 7137-7150.
33. MAHARANA, Shovamayee, et al. RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science*, 2018, 360.6391: 918-921.
34. ALBERTI, Simon, et al. A user's guide for phase separation assays with purified proteins. *Journal of molecular biology*, 2018, 430.23: 4806-4820.
35. GIANNATTASIO, G.; ZANINI, A.; MELDOLESI, J. Molecular organization of rat prolactin granules: in vitro stability of intact and "membraneless" granules. *The Journal of cell biology*, 1975, 64.1: 246-251.
36. GOMES, Edward; SHORTER, James. The molecular language of membraneless organelles. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294.18: 7115-7127.
37. HANDWERGER, Korie E.; CORDERO, Jason A.; GALL, Joseph G. Cajal bodies, nucleoli, and speckles in the *Xenopus* oocyte nucleus have a low-density, sponge-like structure. *Molecular biology of the cell*, 2005, 16.1: 202-211.
38. ANDERSEN, Jens S., et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Current biology*, 2002, 12.1: 1-11.
39. SCHERL, Alexander, et al. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Molecular biology of the cell*, 2002, 13.11: 4100-4109.
40. TSAI, Robert YL; MCKAY, Ronald DG. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes & development*, 2002, 16.23: 2991-3003.
41. PEDERSON, Thoru. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic acids research*, 1998, 26.17: 3871-3876.
42. BERRY, Joel, et al. RNA transcription modulates phase transition-driven nuclear body assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112.38: E5237-E5245.
43. FERIC, Marina, et al. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell*, 2016, 165.7: 1686-1697.
44. RAŠKA, Ivan. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends in cell biology*, 2003, 13.10: 517-525.
45. MONNERON, Ariane; BERNHARD, W. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *Journal of ultrastructure research*, 1969, 27.3-4: 266-288.

46. LYON, Carol E., et al. Inhibition of protein dephosphorylation results in the accumulation of splicing snRNPs and coiled bodies within the nucleolus. *Experimental cell research*, 1997, 230.1: 84-93.
47. CARMO-FONSECA, Maria; FERREIRA, João; LAMOND, Angus I. Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis--evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *The Journal of cell biology*, 1993, 120.4: 841-852.
48. SCHUL, Wouter, et al. The RNA 3' cleavage factors CstF 64 kDa and CPSF 100 kDa are concentrated in nuclear domains closely associated with coiled bodies and newly synthesized RNA. *The EMBO journal*, 1996, 15.11 : 2883-2892.
49. MONNERON, Ariane; BERNHARD, W. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *Journal of ultrastructure research*, 1969, 27.3-4: 266-288.
50. BECK, J. Swanson. Variations in the morphological patterns of " autoimmune " nuclear fluorescence. *The Lancet*, 1961, 277.7188: 1203-1205.
51. FU, XIANG-DONG. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *Rna*, 1995, 1.7: 663.
52. BREDE, Gaute; SOLHEIM, Jorun; PRYDZ, Hans. PSKH1, a novel splice factor compartment-associated serine kinase. *Nucleic acids research*, 2002, 30.23: 5301-5309.
53. FAKAN, Stanislav. Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends in cell biology*, 1994, 4.3: 86-90.
54. MISTELI, Tom; CÁCERES, Javier F.; SPECTOR, David L. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, 1997, 387.6632: 523-527.
55. SCHUL, Wouter; VAN DRIEL, Roel; DE JONG, Luitzen. A subset of poly (A) polymerase is concentrated at sites of RNA synthesis and is associated with domains enriched in splicing factors and poly (A) RNA. *Experimental cell research*, 1998, 238.1: 1-12.
56. DOSTIE, Josée; LEJBKOWICZ, Flavio; SONENBERG, Nahum. Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *The Journal of cell biology*, 2000, 148.2: 239-246.
57. SHARMA, Alok, et al. Son is essential for nuclear speckle organization and cell cycle progression. *Molecular biology of the cell*, 2010, 21.4: 650-663.
58. SPECTOR, David L.; LAMOND, Angus I. Nuclear speckles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2011, 3.2: a000646.
59. FOX, Archa H., et al. Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Current Biology*, 2002, 12.1: 13-25.
60. SASAKI, Yasnory TF, et al. MENε/β noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106.8: 2525-2530.

61. CLEMSON, Christine M., et al. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Molecular cell*, 2009, 33.6: 717-726.
62. XIE, Sheila Q., et al. Splicing speckles are not reservoirs of RNA polymerase II, but contain an inactive form, phosphorylated on serine2 residues of the C-terminal domain. *Molecular biology of the cell*, 2006, 17.4: 1723-1733.
63. PRASANTH, Kannanganattu V., et al. Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell*, 2005, 123.2: 249-263.
64. ZHANG, Zuo; CARMICHAEL, Gordon G. The fate of dsRNA in the nucleus: a p54nrb-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell*, 2001, 106.4: 465-476.
65. JAIN, Saumya, et al. ATPase-modulated stress granules contain a diverse proteome and substructure. *Cell*, 2016, 164.3: 487-498.
66. MARKMILLER, Sebastian, et al. Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules. *Cell*, 2018, 172.3: 590-604. e13.
67. KEDERSHA, Nancy L., et al. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of cell biology*, 1999, 147.7: 1431-1442.
68. NOVER, L. U. T. Z.; SCHARF, KLAUS-DIETER; NEUMANN, DIETER. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Molecular and cellular biology*, 1989, 9.3: 1298-1308.
69. NUNES, Catarina, et al. MSGP: the first database of the protein components of the mammalian stress granules. *Database*, 2019, 2019.
70. WOLOZIN, Benjamin; IVANOV, Pavel. Stress granules and neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 2019, 20.11: 649-666.
71. GUPTA, Nisha, et al. Stress granule-associated protein G3BP2 regulates breast tumor initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114.5: 1033-1038.
72. STROM, Amy R., et al. Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*, 2017, 547.7662: 241-245.
73. LI, Lei, et al. Dynamic nature of cleavage bodies and their spatial relationship to DDX1 bodies, Cajal bodies, and gems. *Molecular biology of the cell*, 2006, 17.3: 1126-1140.
74. LAFARGA, Miguel, et al. Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Molecular biology of the cell*, 2002, 13.8: 2771-2782.

75. LÅNG, Anna; LÅNG, Emma; BØE, Stig Ove. PML Bodies in Mitosis. *Cells*, 2019, 8.8: 893.
76. KIM, Seung Joong, et al. Integrative structure and functional anatomy of a nuclear pore complex. *Nature*, 2018, 555.7697: 475-482.
77. ELBAUM-GARFINKLE, Shana, et al. The disordered P granule protein LAF-1 drives phase separation into droplets with tunable viscosity and dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112.23: 7189-7194.
78. KIEBLER, Michael A.; BASSELL, Gary J. Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron*, 2006, 51.6: 685-690.
79. HAMMERLING, Michael J., et al. In vitro ribosome synthesis and evolution through ribosome display. *Nature Communications*, 2020, 11.1: 1-10.
80. KENNEDY, Mary B.; MASTRO, Tara L. Liquid Phase Transition in the Postsynaptic Density?. *Trends in biochemical sciences*, 2017, 42.1: 2-4.
81. HAMMERLING, Michael J., et al. In vitro ribosome synthesis and evolution through ribosome display. *Nature Communications*, 2020, 11.1: 1-10.
82. NEUMANN, Manuela, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 2006, 314.5796: 130-133.
83. DENG, Han-Xiang, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, 2011, 477.7363: 211-215.
84. BOSCO, Daryl A., et al. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nature neuroscience*, 2010, 13.11: 1396-1403.
85. BROWN, Robert H.; AL-CHALABI, Ammar. Amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377.2: 162-172.
86. ESCLATINE, Audrey; TADDEO, Brunella; ROIZMAN, Bernard. Herpes simplex virus 1 induces cytoplasmic accumulation of TIA-1/TIAR and both synthesis and cytoplasmic accumulation of tristetraprolin, two cellular proteins that bind and destabilize AU-rich RNAs. *Journal of virology*, 2004, 78.16: 8582-8592.
87. LI, W., et al. Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *Journal of virology*, 2002, 76.23: 11989-12000.
88. KATSAFANAS, George C.; MOSS, Bernard. Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell host & microbe*, 2007, 2.4: 221-228.

89. SOLA, Isabel, et al. The polypyrimidine tract-binding protein affects coronavirus RNA accumulation levels and relocalizes viral RNAs to novel cytoplasmic domains different from replication-transcription sites. *Journal of virology*, 2011, 85.10: 5136-5149.
90. GAETE-ARGEL, Aracelly, et al. Strategies for Success. Viral infections and membraneless organelles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2019, 9.
91. LICHTMAN, Jeff W.; CONCHELLO, José-Angel. Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2005, 2.12: 910-919.
92. AXELROD, Daniel, et al. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical journal*, 1976, 16.9: 1055.
93. WÜSTNER, Daniel, et al. Quantitative fluorescence loss in photobleaching for analysis of protein transport and aggregation. *BMC bioinformatics*, 2012, 13.1: 296.
94. NOMARSKI, Georges; WEILL, Adrienne R. Sur l'observation des figures de croissance des cristaux par les méthodes interférentielles à deux ondes. *Bulletin de Minéralogie*, 1954, 77.4: 840-868. (sekundární citace)
95. NOTT, Timothy J., et al. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles. *Molecular cell*, 2015, 57.5: 936-947.
96. VINCENT, Walter S. The isolation and chemical properties of the nucleoli of starfish oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1952, 38.2: 139.
97. MEIKAR, Oliver, et al. Accumulation of piRNAs in the chromatoid bodies purified by a novel isolation protocol. *Experimental cell research*, 2010, 316.9: 1567-1575.
98. WHEELER, Joshua R., et al. Isolation of yeast and mammalian stress granule cores. *Methods*, 2017, 126: 12-17.
99. HANDWERGER, Korie E.; CORDERO, Jason A.; GALL, Joseph G. Cajal bodies, nucleoli, and speckles in the *Xenopus* oocyte nucleus have a low-density, sponge-like structure. *Molecular biology of the cell*, 2005, 16.1: 202-211.
100. MINTON, Allen P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *Journal of biological chemistry*, 2001, 276.14: 10577-10580.
101. TARATUTA, Victor G., et al. Liquid-liquid phase separation of aqueous lysozyme solutions: effects of pH and salt identity. *Journal of Physical Chemistry*, 1990, 94.5: 2140-2144.
102. MITREA, Diana M., et al. Methods for physical characterization of phase-separated bodies and membrane-less organelles. *Journal of molecular biology*, 2018, 430.23: 4773-4805.

103. MIZUNO, Daisuke, et al. Active and passive microrheology in equilibrium and nonequilibrium systems. *Macromolecules*, 2008, 41.19: 7194-7202.
104. JAWERTH, Louise M., et al. Salt-dependent rheology and surface tension of protein condensates using optical traps. *Physical review letters*, 2018, 121.25: 258101.
105. WEIHS, Daphne; MASON, Thomas G.; TEITELL, Michael A. Bio-microrheology: a frontier in microrheology. *Biophysical journal*, 2006, 91.11: 4296-4305.
106. LANCASTER, Alex K., et al. PLAAC: a web and command-line application to identify proteins with prion-like amino acid composition. *Bioinformatics*, 2014, 30.17: 2501-2502.
107. DIGNON, Gregory L., et al. Sequence determinants of protein phase behavior from a coarse-grained model. *PLoS computational biology*, 2018, 14.1: e1005941.
108. QIN, Sanbo; ZHOU, Huan-Xiang. Fast method for computing chemical potentials and liquid–liquid phase equilibria of macromolecular solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2016, 120.33: 8164-8174.
109. ZHANG, Liquan; BORTHAKUR, Susmita; BUCK, Matthias. Dissociation of a dynamic protein complex studied by all-atom molecular simulations. *Biophysical journal*, 2016, 110.4: 877-886.